

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-310457

(43)Date of publication of application : 26.12.1990

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

(21)Application number : 01-133446

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

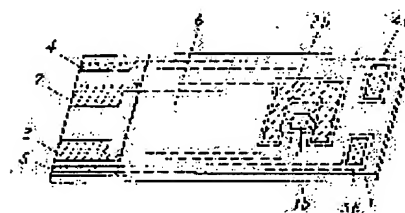
(22)Date of filing : 26.05.1989

(72)Inventor : KAWAGURI MARIKO  
FUJITA MAYUMI  
NANKAI SHIRO  
YOSHIOKA TOSHIHIKO  
IJIMA TAKASHI

**(54) BIOSENSOR****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To improve the measurement accuracy of the sensor by forming an enzyme reaction layer consisting of an oxidation reduction enzyme, hydrophilic high polymer and electron acceptor on the surface of electrode systems.

**CONSTITUTION:** The sensor is constituted in the following manner: Conductive carbon paste is printed on an insulating substrate 1 consisting of, for example, polyethylene terephthalate and is dried by heating to form the electrode system consisting of counter electrodes 2, 4 and measuring electrodes 3, 5. The electrodes 4, 5 are the electrodes for removing disturbing materials and the electrodes 2, 3 detect the concn. of the substrate. The insulating paste is then so printed as to partially coat the electrode system and to leave 2b to 5b to form electrically acting parts of the respective electrodes and is subjected to a heating treatment to form the length of the insulating layer. An aq. soln. of CMC (carboxymethylcellulose) is applied on the electrode systems 2b, 3b so as to cover the surfaces and oxidation reduction enzyme glucose oxidase (GOD) is applied on the resulted CMC layer and is dried, on the surface of which a potassium ferricyanide layer is formed to obtain the enzyme reaction layer 7.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-310457

⑬ Int.Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 27/327

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)12月26日

7363-2G G 01 N 27/30  
7363-2G

3 5 3 J  
R

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 平1-133446

⑰ 出 願 平1(1989)5月26日

|         |            |                  |             |
|---------|------------|------------------|-------------|
| ⑱ 発 明 者 | 河 栗 真 理 子  | 大阪府門真市大字門真1006番地 | 松下電器産業株式会社内 |
| ⑱ 発 明 者 | 藤 田 真 由 美  | 大阪府門真市大字門真1006番地 | 松下電器産業株式会社内 |
| ⑱ 発 明 者 | 南 海 史 朗    | 大阪府門真市大字門真1006番地 | 松下電器産業株式会社内 |
| ⑱ 発 明 者 | 吉 岡 俊 彦    | 大阪府門真市大字門真1006番地 | 松下電器産業株式会社内 |
| ⑱ 発 明 者 | 飯 島 孝 志    | 大阪府門真市大字門真1006番地 | 松下電器産業株式会社内 |
| ⑲ 出 願 人 | 松下電器産業株式会社 | 大阪府門真市大字門真1006番地 |             |
| ⑳ 代 理 人 | 弁理士 栗野 重孝  | 外1名              |             |

明 細 書

1、 発明の名称

バイオセンサ

2、 特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系が形成された絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層が設けられ、さらに、妨害物質除去用の電極部が付加されてなり、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。

(2) 少なくとも測定極と対極からなる電極系が形成された絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び界面活性剤を含有した電子受容体からなる酵素反応層が設けられ、さらに、妨害物質除去用の電極部が付加されてなり、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定することを特徴

とするバイオセンサ。

(3) 電極系が、絶縁性の基板上にスクリーン印刷で形成されたカーボンを主体とする材料からなることを特徴とする請求項1または2記載のバイオセンサ。

(4) 酵素反応層及び妨害物質除去用の電極部を内側に含むようにカバーを設置したことを特徴とする請求項1または2記載のバイオセンサ。

3、 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なう事なく簡易に定量しうる方式として、第5図に示すようなバイオセンサを提案した。このバイオセンサは、絶縁性の基板11上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系12、13を形成し

特開平2-310457(2)

前記電極12、13上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体からなる酵素反応層15を形成したものである。試料液を酵素反応層15へ滴下すると、酸化還元酵素と電子受容体が試料液中に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。反応終了後、還元された電子受容体を電極により酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする課題

このような従来の構成では、試料液中に還元性の物質が含有されている場合、反応時に電子受容体と反応したり電極反応が影響されて応答がばらついたりした。

本発明は、このような従来技術の課題を解決することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明は、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度

を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を形成し、さらに妨害物質除去用の電極部を付加するものである。

作用

本発明によれば、電極系をも含めたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができ、試料液をセンサに添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。しかも、試料の添加時に妨害物質除去用の電極部で試料液中の還元性の物質を電解酸化するため応答への影響がなくなり、安定した応答が得られる。

実施例

以下に、本発明の実施例について図面を参照しながら説明する。

実施例1

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図及び第2図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、バイオセンサの斜視図と縦断面図である。ポリエチ

レンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、4測定極3、5からなる電極系を形成する。電極4、5は妨害物質除去用の電極で電極2、3は基質の濃度を検知するための電極である。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2a、3a、4a、5aを残すように絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱処理をして絶縁層6を形成する。この電極系(2a、3a)の表面を覆うようにセルロース系の親水性高分子の一種であるCMC(カルボキシメチルセルロース)の水溶液を塗布し、45℃で30分乾燥した。得られたCMC層の上に酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD)をpH5.6のリン酸緩衝液に溶解したものを塗布した後、室温で乾燥した。その上に有機溶媒としてエタノールに電子受容体であるフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを滴下し、室温で放置してエタノールを気化させることによりフェリシアン化カ

リウム層を形成した。以上のようにして形成したCMC、GOD、フェリシアン化カリウム層を酵素反応層7とする。さらに、対極4aと測定極5aからなる妨害物質除去用の電極部を試料供給部とする。上記のように構成したグルコースセンサにあらかじめ妨害物質用電極部に対極4を基準に測定極5にアノード方向に+0.6Vの定電圧を印加する。試料液として血清を試料供給部に10μl滴下し、1分後に対極2を基準にして測定極3にアノード方向へ+0.6Vのパルス電圧を印加し5秒後の電流を測定する。血清を添加すると、妨害物質除去用の電極4a、5aにより血清中の還元物質であるアスコルビン酸などが電解酸化されてフェリシアン化カリウムと反応するのを妨害する。さらに、妨害物質が除去された血清により酵素反応層7のフェリシアン化カリウムが溶解し、血清中のグルコースがGODにより酸化される際フェロシアン化カリウムに還元される。そこで、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得ら

れ この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。グルコースの濃度が500 mg/dlという高濃度まで良好な直線性が得られた。つぎにグルコース標準液に還元性物質の代表としてアスコルビン酸を10 mg/dl加え、測定したところ妨害物質除去用の電極に定電圧を印加した場合はほとんどアスコルビン酸の影響がみられなかったが印加しない場合はグルコース濃度100 mg/dlにおいて約20%も高い応答が得られた。これはアスコルビン酸がフェリシアン化カリウムと反応してフェロシアン化カリウムが生成し、見かけ上正の誤差が生じたものと考えられる。妨害物質除去用の電極により、アスコルビン酸を前もって酸化して影響を除去することが出来た。

#### 実施例2

実施例1に示したようにしてCMC-GOD層を形成した後、フェリシアン化カリウム層を形成する際エタノールに界面活性剤としてレシチン（ホスファチジルコリン）を溶解して0.5 wt%溶液を調製し、これにフェリシアン化カリウム

の微結晶を混ぜたものを用いてフェリシアン化カリウムとレシチンの層を形成した。レシチンの濃度が0.01 wt%以上になるとフェリシアン化カリウムがうまくエタノール中で分散したため滴下が容易となり、3  $\mu$ lの微量な液でも薄膜状のフェリシアン化カリウム-レシチン層が形成できた。レシチンがない場合はフェリシアン化カリウム層が不均一に形成されたり基板をまげるとはがれるという欠点が見られたが、レシチンを添加することにより均一ではがれにくいフェリシアン化カリウム層が容易に形成できた。レシチンの濃度が高くなるとともに、フェリシアン化カリウム層がはがれにくくなるが、フェリシアン化カリウムの溶解速度も落ちるため、0.01-3 wt%が適当と考えられる。また、妨害物質除去用の電極部の上も0.5 wt%になるようにレシチンをトルエンに溶解し、塗布、乾燥させてレシチンの薄い膜を形成させ、試料液が酵素反応層へ移行し易いようにした。上記センサにグルコース標準液を滴下して実施例1と同様にして応答を測定したところ、グルコー

ス濃度500 mg/dlまで直線性が得られた。さらに血液を滴下したところ、レシチン層によりすみやかに妨害物質用の電極にひろがりその後酵素反応層へ流れていき反応が始まったため、6  $\mu$ lという微量のサンプルでも再現性のよい応答が得られた。レシチンのかわりにポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル（商品名：トリトンX）を用いたところ、フェリシアン化カリウムの微粒子をエタノール中に分散させるためには0.1 wt%以上必要であったが、レシチンと同様に良好なフェリシアン化カリウム層が形成できた。界面活性剤としては、前記の例の他に、オレイン酸やポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルやシクロデキストリンなど、電子受容体を有機溶媒に分散させ、かつ酵素活性に影響をおよぼさないものであれば、特に制限されることはない。

親水性高分子としてCMCの他にもゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、でんぷん系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロ

リドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの高分子は容易に水溶液とすることができ、適当な濃度の水溶液を塗布、乾燥することにより、必要な厚さの薄膜を電極上に形成することができる。

電子受容体を混合する有機溶媒としては、トルエンやエタノール、石油エーテルなど、GOD活性および印刷電極への影響の少ないものであればよい。

電極系を形成する方法としてのスクリーン印刷は、均一な特性を有するディスポーザブルタイプのバイオセンサを安価に製造することができ、特に、価格が安く、しかも安定した電極材料であるカーボンを用いて電極を形成するのに好都合な方法である。

#### 実施例3

実施例2に示した構成のセンサに第3図に示すようにカバー8をつけた。このカバー8により形成された先端の試料供給部に妨害物質用の電極を設置し、界面活性剤を付加した。血液をカバー8

の試料供給部に供給すると、界面活性剤によりすみやかに妨害物質除去用電極部に導入され還元性の物質が酸化されて除去されたのち、測定電極部に広がり、酵素反応層7で反応が進み再現の良い応答が得られた。カバー8内の容積を小さくすることで、サンプル量を微量にすることができた。さらに、カバー8で囲むことにより、外気と遮断できるため、カバー8内の試料の蒸発を防ぐことが出来た。

#### 実施例4

実施例3に示したカバー付のバイオセンサにおいて、その試料供給口をナイロン不織布9で第4図のようにふさいだ。血液を試料供給口へ付着させるとナイロン不織布9を通過して酵素反応層へ流れた。そのあいだに、試料中の還元性の物質が妨害物質除去用の電極で反応して除去されるとともに血球などの大きな分子がナイロン不織布9に吸着して除去され、試料の粘度が下がるため、反応速度が増した。担体としては、ナイロン不織布9の他にバルブ、ガラス繊維、ポリカーボネート

多孔体膜などが使用できた。

なお、本発明のバイオセンサは上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素として実施例1、2、3、4ではグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、等を用いることができる。また、電子受容体として、上記実施例に用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので適しているがP-ベンソキノンを使えば、反応速度が大きいので高速化に適している。また、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、β-ナフトキノン4-スルホン酸カリウム、フェロセン等が使用できる。

#### 発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に電極系を印刷し、酸化還元酵素と親水性

高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を形成し、さらに、妨害物質除去用の電極を設け、あらかじめ生体試料中に存在する還元性の物質を除去して極めて容易に生体試料中の基質濃度を測定することができ、測定精度を向上させる事ができるものである。また、電子受容体層を形成するとき界面活性剤を添加することにより、微量の電子受容体を均一にかつはがれにくい薄膜層に担持でき、保存性や大量生産に大きな効果がある。

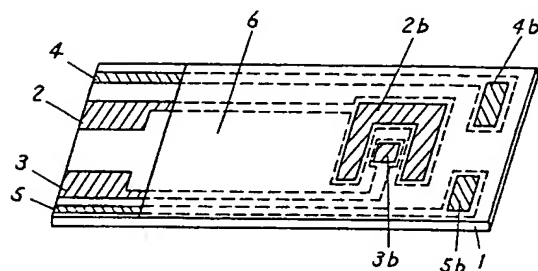
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例のバイオセンサの斜視図、第2図、第3図及び第4図は同バイオセンサの各実施例の縦断面図、第5図は従来例のバイオセンサの縦断面図である。

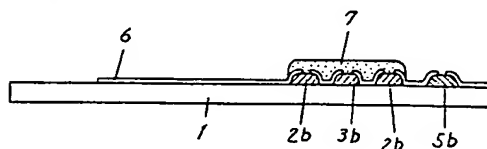
1…基板、2, 2b, 4, 4b, 12…対極、3, 3b, 5, 5b, 13…測定極、6, 14…絶縁層、7, 15…酵素反応層、8…カバー、9…ナイロン不織布。

代理人の氏名 弁理士 栗野重孝 ほか1名

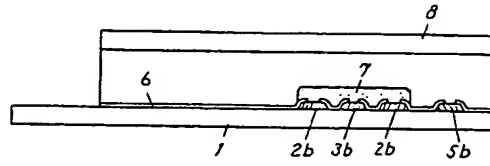
第1図  
1…基板  
2,4…対極  
3,5…測定極  
6…絶縁層  
7…酵素反応層



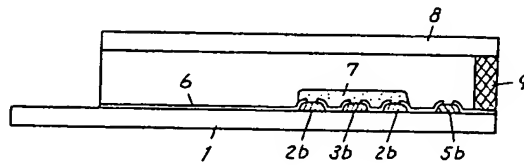
第2図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

